

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/531 G01N 33/558

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01109088. X

[43]公开日 2001 年 9 月 12 日

[11]公开号 CN 1312470A

[22]申请日 2001.2.28 [21]申请号 01109088. X
[71]申请人 王慧珍
地址 100730 北京市东城区帅府园 1 号北京协和医院检验科荧光免疫室
共同申请人 李永哲 崔京涛
[72]发明人 王慧珍 李永哲 崔京涛

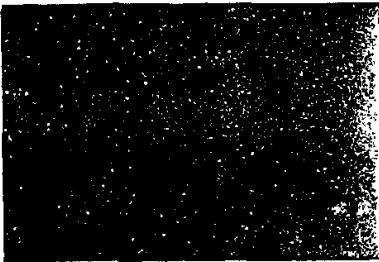
[74]专利代理机构 北京科龙环宇专利事务所
代理人 孙皓晨

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 马疫锥虫抗原片检测试剂及其制备与应用

[57]摘要

抗双链脱氧核糖核酸(ds-DNA)抗体是系统性红斑狼疮(SLE)高度特异性抗体,并与 SLE 疾病活动性密切相关。本发明研制了检测抗 ds-DNA 抗体检测试剂马疫锥虫(TE)抗原片,以及利用该试剂建立了间接免疫荧光法(TE-IF)检测抗 ds-DNA 抗体的方法,该方法特异性强,重复性好,结果稳定可靠。



应用马疫锥虫抗原片检测抗ds DNA抗体阳性(低倍镜)

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1、一种抗 ds-DNA 检测试剂马疫锥虫抗原片其特征在于由下列步骤制备的：

A.马疫锥虫的繁殖；B.制备马疫锥虫抗原片。

2、根据权利要求 1 所述的抗原片，其中步骤 A 包括：将马疫锥虫菌株接种于小白鼠腹部皮下，感染 2-4 日后，从小白鼠尾部取血置玻片上，显微镜下观察，高倍镜下每视野达 30-40 条马疫锥虫时即可使用。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的抗原片，其中步骤 B 包括：

从感染的小白鼠眼眶部取血，加入到添加了抗凝剂的试管中，用毛细血管从中取血，在玻片上涂成圆点，自然晾干，加入有干燥剂的锡铂纸包装袋中，用热合器封袋，置于-20℃冰箱中保存待用。

4、一种抗 ds-DNA 的检测方法，其特征在于将被检血清滴加于权利要求 1 所述的抗原片试剂的抗原孔上，37° C 温育 30 分钟，用 PBS 摇体洗涤三次，每次 5 分钟，风干后滴加羊或兔抗人 Ig G 荧光标记抗体于抗原片上，同上法温度、洗涤、风干，用 PH7.4 缓冲甘油封片，用荧光显微镜观察。

说明书

马疫锥虫抗原片检测试剂及其制备与应用

本发明涉及免疫诊断领域，涉及系统性红斑狼疮（SLE）的临床诊断，更具体地说，涉及马疫锥虫抗原片，及其制备以及应用该检测试剂临床检测 SLE 的高度特异性抗体抗双链脱氧核糖核酸（ds-DNA）抗体的存在。

抗双链脱氧核糖核酸（ds-DNA）抗体是 SLE 高度特异抗体，在其它情况下很少能检测到，并与 SLE 疾病活动性密切相关，被公认为诊断 SLE 的指标之一。抗 ds-DNA 抗体不仅对于 SLE 的诊断和鉴别诊断有重要意义，而且对于监视治疗和病情追踪以及判定预后等亦有重要意义。间接免疫荧光法（IIF）为目前临床常规检测抗 ds-DNA 抗体最常用的方法。1964 年 Beck 等证明锥虫类（单细胞）的核和动基体为纯 ds-DNA，不含组蛋白等其它成份。1975 年 Aarden 等报告用短膜虫（*Crithidia Lucilia*, CL）培养片，1978 年 Konice 等报告采用感染马疫锥虫（*Trypaosoma Epuiperdum*, TE）的大鼠血涂片作为抗原底物，采用 IIF 法测定抗 ds-DNA 抗体。

抗 DNA 抗体可大体分为与天然（双链）DNA 反应的抗体和与变性（单链）DNA 反应的抗体两种。

抗双链 DNA（ds-DNA）抗体：主要见于 SLE，阳性率在 40%左右，以上为活动期患者，而在非 SLE 患者和正常人则多为阴性。有时其它结缔组织病患者抗 ds-DNA 也可为阳性，如干燥综合征（SS）、药物性狼疮（DIL）、混合性结缔组织病（MCTD）等，但阳性率低，一般<10%，抗体滴度也较低，且此类病人一般认为是 SLE 重叠综合征。由于抗 ds-DNA 抗体对 SLE 具有高度特异性，因此是目前公认的 SLE 血清特异性抗体，被列为 SLE 诊断标准之一。抗 ds-DNA 抗体在 SLE 的发病机理中起重要作用：SLE 并发的肾炎（狼疮性肾炎）是由抗 DNA 抗体介导的一种免疫复合物病。抗 ds-DNA 抗体亦可形成多种冷沉淀而致血管炎。该抗体的存在易引起 SLE 肾炎和典型的蝶形红斑。抗 ds-DNA 抗体与 SLE 疾病活动性关系密切，其抗体滴度多与 SLE 疾病的活动性而升降，活动期增高，缓解期降低甚至转阴。因此，抗 ds-DNA 抗体对 SLE 疾病活动期的判断和药物疗效观察很有帮助。

抗单链 DNA（SS-DNA）抗体：双链 DNA 变性时，双链断开即成单链 DNA（SS-DNA）。抗 SS-DNA 可存在于多种自身免疫性疾病中，包括 SLE、DIL、MCTD、SS、PSS（硬皮病）、PM/DM（皮肌炎或多发性肌炎）；也可存在于一些非自身免疫性疾病，如慢性活动性肝炎、细菌和病毒感染。因此，抗 SS-DNA 抗体对疾病诊断缺乏特异性，在临床上无实用价值。

抗 ds-DNA 抗体的检测方法很多，目前临床常规检测广泛应用的方法有：间接免疫荧光法（IIF）、放射免疫分析法（RIA）、酶联免疫吸附试验（ELISA）等。

IIF:

可分为马疫锥虫法（TE-IIF）和短膜虫法（CL-IIF）两种。是目前国内外临床常规检测抗 ds-DNA 抗体最常用的方法。IIF 法具有特异性强、敏感性高、结果可靠、重复性好等优点；此外，该法实验要求的条件低、操做简便、价格便宜、易于推广。有关资料显示 IIF 法和 Farr 法比较，两者符合率达 90%，IIF 法敏感性略逊于 Farr 法，但特异性高，无假阳性反应；TE-IIF 法和 CL-IIF 法两者符合率为 88.70%；TE-IIF 法在检测抗 ds-DNA 抗体同时，可利用抗原基质片中鼠白细胞检测 ANA，发现测得结果与常规的鼠肝冰冻切片法的结果有良好的可比性（ $r=0.9265, p<0.01$ ）两者核型和滴度基本相符。IIF 法存在的问题是抗原基质片制备困难。马疫锥虫法需在小鼠传代。使用不便；短膜虫法需培养及虫和传代保存，长期长传代，操作不当，易于污染。另有文献报告 CL 动基体含组蛋白，可与待测血清中抗组蛋白抗体交叉反应而致假阳性。

RIA（Farr 法）：

Farr 法测定的重复性好，可定量，敏感性较 IIF 法略高，但特异性差，需仪器设备，要求的实验室条件较高，并存在同位素污染及假阳性问题。Farr 法则定抗 ds-DNA 抗体，在 7% 的正常人中呈假阳性反应，并在非 SLE 的结缔组织病中也呈低滴度的阳性反应，这可能与国内生产的检测药盒中的抗原 ds-DNA 不够纯有关。文献报告 Ids-DNA 中含 ss-DNA 1% 引起的假阳性就达 6%。此外标记 ds-DNA 有时与非抗体蛋白[低密度脂蛋白和（或）补体成份] 结合，亦可引起假阳性结果。

ELLSA:

不需特殊设备（同位素测定仪，荧光显微镜等），但操作繁锁，较 IIF 未见有更多的优点。ELISA 法中存在的主要问题是，同 Farr 法一样，如人工纯化的 ds-DNA 抗原不纯，易引起假阳性反应；此外 DNA 抗原不易吸附于固相载体上，即 ds-DNA 抗原包被困难。采取预包被措施易引入产生非特异反应的物质或造成 ds-DNA 变性、解链。以上结果都可致假阳性结果，影响该法特异性。

附表 IIF 法和 Farr 法检测抗 ds-DNA 抗体比较（北京协和医院资料）

IE-IIF 法	CL-IIF 法	Farr 法	
SLE	51.2%	46.9%	62.0%
SLE 活动期	100%	93.6%	67.7%
SLE 非活动期	9.5%	3.0%	29.1%
结缔组织病（非 SLE）	3.0%	2.7%	20.2%

非结缔组织病	0	1.8%	12.9%
正常人	0	0	7.0%

本发明的目的之一是研制检测抗 ds-DNA 抗体检测试剂马疫锥虫抗原片。

本发明的另一目的是提供了利用马疫锥虫抗原 (TE) 体检测抗 ds-DNA, 为 SLE 疾病的诊断提供重要指标。

本发明是如下所述实现的:

马疫锥虫抗原片制备

1、马疫锥虫繁殖:

将马疫锥虫菌株从液氮中取出, 溶化后将其接种于小鼠腹部皮下, 感染 2-4 日, 从小白鼠尾部取血置玻片上, 显微镜下观察, 高倍镜下每视野达 30-40 条马疫锥虫时即可制片。

2、马疫锥虫抗原片制备:

从感染的小白鼠眼眶部取血。加入添加适量抗凝剂的玻璃试管中, 用毛细玻璃管取血, 在玻片上涂成直径 0.5cm×0.5cm 大小圆点, 每张片涂十孔, 自然晾干, 加入干燥剂置锡铂纸包装袋中, 用热合器封袋, 置-20℃冰箱中保存待用。

3、马疫锥虫抗原片鉴定:

A、DNA 抑制试验:

将已知强阳性反应的病人血清与双链 DNA (小牛胸腺 DNA、按 0.1-0.3mg/ml 不同浓度配制) 相互作用 30-45 分钟, 然后用该血清作用底物, 继用羊或兔抗人 IgG 荧光标记抗体染色镜检, 同时用该病人的阳性血清对照。

B、RNA 抑制试验:

将已知强阳性血清与 RNA (1mg/ml) 相互作用 30-45 分钟, 然后用该血清作用底物, 继用羊或兔抗人 IgG 荧光标记抗体染色镜检, 同时做阳性对照。

C、DNA 酶消化试验:

将 DNA 酶 (0.1mg/ml) 与抗原底物分别作用 1、2、4、6 小时, 然后洗去 DNA 酶, 再加已知的强阳性血清, 继用羊或兔抗人 IgG 荧光标记抗体染色镜检, 同时做阳性对照。

D、RNA 酶消化试验:

将 RNA 酶 (1mg/ml, 0.5mg/ml 不同浓度) 与底物分别作用 1、2、4、6 小时, 然后洗去 RNA 酶, 再加已知的强阳性血清, 继用羊或兔抗人 IgG 荧光标记抗体染色镜检, 同时做阳性对照。

E、对照试验:

用 DNA 阳性血清和 DNA 阴性血清分别加在已制备好了的抗原片上，反应 30 分钟后，加羊或兔抗人 IgG 荧光标记抗体再反应 30 分钟后，荧光显微镜下观察结果，阳性血清下的马疫锥虫动基体和核均有特异性荧光染色，阴性血清则无特异性荧光。

二、TE 抗原片检测 ds-DNA 抗体

马疫锥虫 (TE) 是一种致马类性病 (马媾疫) 的锥虫，对人类和其它家畜无致病作用。TE 的核 (Nuclear) 和动基体 (Kinetoplast) 为不含组蛋白亦无单链 DNA 的纯 ds-DNA 抗原，抗原性纯一、特异，不需要复杂的分离提纯，故为检测抗 ds-DNA 抗体具有高度特异性的天然底物。采用感染 TE 的小鼠血涂片作抗原底物，IIT 法检测抗 ds-DNA 抗体，阳性时可见到 TE 核及动基体发出特异性荧光。阴性时 TE 核及动基体均不发荧光，但虫体轮廓隐约可见。

TE 抗原片中含有鼠血中的白细胞，IIF 检测抗 ds-DNA 抗体的同时，亦可检测抗核抗体 (ANA)。阳性结果核型观察略逊于鼠肝冰冻切片法，但也可用做 ANA 定性过筛检测。

(一) 操作

1、将 TE 抗原片从铝箔包装袋取出后立即用电风扇吹干。将抗原片置蒸馏水中 30 秒-1 分钟，溶解掉鼠血中红细胞，待干。

2、将被检血清用 0.01mol/L pH7.4 PBS 1:5 稀释后，滴加于抗原上。

3、置湿盒 37℃温育 30 分钟。

4、继用同一 PBS 摇床上洗涤三次，每次 5 分钟。

5、风干后滴加最适工作浓度羊或兔抗人 IgG 荧光标记抗体于抗原模上。同上法温育、洗涤、风干。

6、用 PH7.4 缓冲甘油封片，最后用荧光显微镜观察结果。

(二) 结果

1、抗 ds-DNA 抗体阳性：TE 核及动基体发出亮绿色特异性荧光。TE 核较大，动基体较小，成对出现，较易辨认。核和动基体之间及周边有虫体轮廓隐约可见。对于抗 ds-DNA 抗体阳性血清，可用 PBS 做倍比稀释再进行检测抗体滴度。以能显示 TE 动基体荧光的最高稀释度为抗体滴度。

2、抗 ds-DNA 抗体阴性：TE 和动基体均不发荧光，但虫体轮廓隐约可见。

3、ANA 阳性：TE 抗原片中鼠血白细胞发出亮绿色特异性荧光，而且可分辨不同的核型，与鼠肝冰冻切片法所见酷似。两者核型和抗体滴度基本相符。

(三) 注意事项

1、每次实验应设阳性对照和阴性对照。

2、TE 抗原片置-20℃保存，有效期至少一年，应避免反复冻融。短期内使用可置 4℃冰箱保存。

3、TE-IIF 检测抗 ds-DNA 抗体，阳性时 TE 核和动基体应同时发特异性荧光。如出现 TE 核或动基体单独发特异性荧光这两种少见情况，报告结果时应慎重，应结合 ANA、放免法（Farr 氏法）实验结果及临床表现报告，如相符合（ANA 阳性多为均质型、Farr 氏法结合率>20%）亦可报告为 TE-IIF 阳性：否则应复查，查找实验原因。PBS 偏酸时可出现此种假阳性反应，还应排除荧光抗体稀释度不适造成的非特异性荧光干扰。

（四）临床意义

抗 ds-DNA 抗体是 SLE 的高度特异性抗体，是 SLE 诊断指标之一。活动期 SLE，特别是肾型活动 SLE 抗 ds-DNA 抗体为 100%阳性，非肾型活动期 SLE 患者抗 ds-DNA 抗体阳性率 80%左右；而非活动期 SLE 病人，抗 ds-DNA 抗体阳性率 30%以下。其它结缔组织病则阳性率很低（<10%）。抗 ds-DNA 抗体滴度的升降与 SLE 疾病的活动程度相关。因此，抗 ds-DNA 抗体检测可监示 SLE 病情变化、疗效等。

本发明建立的 TE-IIF 检测抗 ds-DNA 抗体的方法，特异性强，重复性好，结果稳定可靠，方法要求条件低，操作简便易于推广。本发明制备的 TE 抗原基质片技术方法稳定，抗原片质量稳定可靠，使用方便。

附图说明如下：

图 1 应用马疫锥虫抗原片检测抗 dsDNA 抗体阳性（低倍镜）；

图 2 应用马疫锥虫抗原片检测抗 dsDNA 抗体阳（高倍镜）。

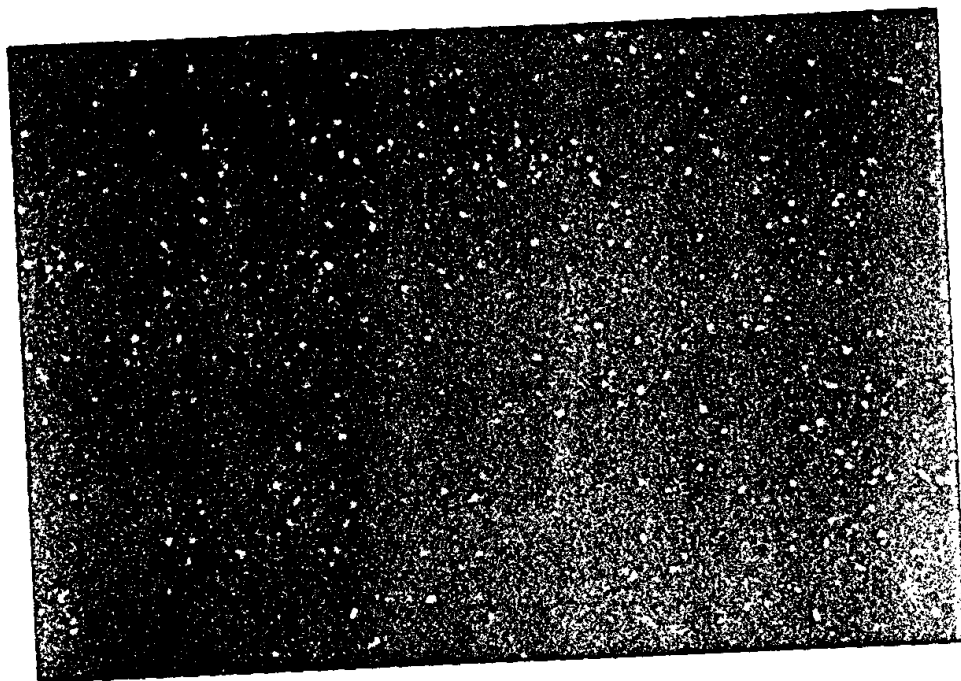


图 1 应用马疫锥虫抗原片检测抗ds DNA抗体阳性(低倍镜)

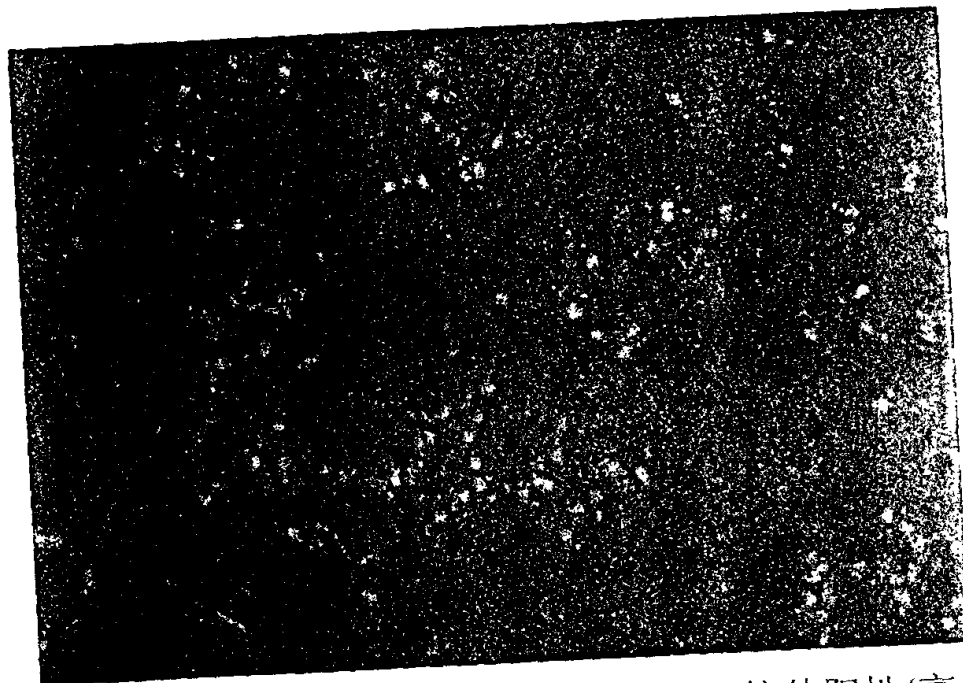
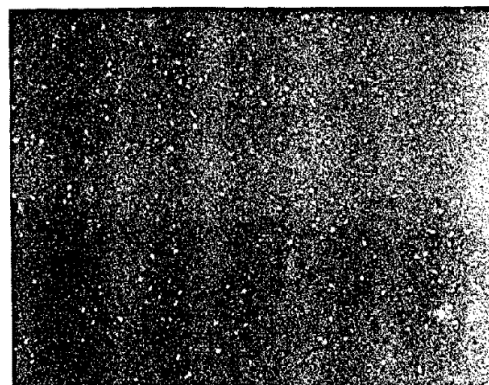


图 2 应用马疫锥虫抗原片检测抗ds DNA抗体阳性(高倍镜)

专利名称(译)	马疫锥虫抗原片检测试剂及其制备与应用		
公开(公告)号	CN1312470A	公开(公告)日	2001-09-12
申请号	CN01109088.X	申请日	2001-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	王慧珍 李永哲		
申请(专利权)人(译)	王慧珍 李永哲		
当前申请(专利权)人(译)	王慧珍 李永哲		
[标]发明人	王慧珍 李永哲 崔京涛		
发明人	王慧珍 李永哲 崔京涛		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	孙皓晨		
其他公开文献	CN1120369C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

抗双链脱氧核糖核酸(ds - DNA)抗体是系统性红斑狼疮(SLE)高度特异性抗体,并与SLE疾病活动性密切相关。本发明研制了检测抗ds - DNA抗体检测试剂马疫锥虫(TE)抗原片,以及利用该试剂建立了间接免疫荧光法(TE - IIF)检测抗ds - DNA抗体的方法,该方法特异性强,重复性好,结果稳定可靠。



应用马疫锥虫抗原片检测抗ds DNA抗体阳性(低倍镜)